



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE MEDICINA**



**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**HOSPITAL REGIONAL 1° DE OCTUBRE
HOSPITAL DARÍO FERNÁNDEZ FIERRO**

**“CARACTERIZACION DEL RITMO CIRCADIANO DE MELATONINA
EN PACIENTES CON SEPSIS Y SEPSIS SEVERA QUE INGRESAN
A LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS”**

Núm. de registro 175.2015

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA
DEL ENFERMO EN ESTADO CRÍTICO.**

P R E S E N T A

OCTAVIO AUGUSTO LESCAS MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: ALBERTO MANUEL ANGELES CASTELLANOS

MÉXICO, D.F. FEBRERO DE 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





Dr. Ricardo Juárez Ocaña

Coordinador de Enseñanza e Investigación
Hospital Regional 1° de Octubre, ISSSTE



Dra. Raquel Méndez Reyes

Profesor Titular del Curso de Medicina del Enfermo en Estado Crítico.
Hospital Regional 1° de Octubre, ISSSTE



Dr. Hugo Aguilar Castillo

Jefe del la Terapia Intensiva. Hospital Darío Fernández Fierro, ISSSTE.

Asesor de Tesis.



**“CARACTERIZACION DEL RITMO CIRCADIANO DE MELATONINA
EN PACIENTES CON SEPSIS Y SEPSIS SEVERA QUE INGRESAN
A LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS”**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: OCTAVIO AUGUSTO LESCAS MÉNDEZ.

DIRECTOR DE TESIS: ALBERTO MANUEL ANGELES CASTELLANOS

ASESORES DE TESIS:

INVESTIGADOR ASOCIADO 1: RAQUEL MÉNDEZ REYES

INVESTIGADOR ASOCIADO 2: HUGO AGUILAR CASTILLO

“Somos lo que repetidamente hacemos, la excelencia entonces no es un acto, es un
habito”.

Aristóteles.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2. EL ORDEN TEMPORAL Y EL SISTEMA CIRCADIANO | 1 |
| 1.3. EL SISTEMA CIRCADIANO ARRITMICO | 3 |
| 1.4. RITMO CIRCADIANO DE MELATONINA | 7 |
| 1.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA | 13 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 4. HIPÓTESIS | 14 |
| 5. OBJETIVOS GENERALES | 14 |
| 5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 14 |
| 6. MÉTODOS Y DISEÑO | 15 |
| 6.1. PROCEDIMIENTOS | 16 |
| 6.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 16 |
| 6.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 16 |
| 6.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN | 16 |
| 6.5. DISEÑO. | 17 |
| 7. RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO | 18 |
| 8. DISCUSIÓN | 23 |
| 8.2. PERSPECTIVAS A FUTURO | 25 |
| 9. BIBLIOGRAFIA | 27 |

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Cronobiología Clínica y Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el apoyo para realizar esta tesis.

Al Dr. Manuel Angeles Castellanos por el apoyo incondicional, por su paciencia, por tolerarme, pero sobre todo, por la amistad y la confianza.

A la Dra. Laura Matilde Ubaldo Reyes, a quien aprecio tanto, gracias por tu gran apoyo, ¡Laurita!

Al Dr. Hugo Aguilar Castillo por su valioso apoyo para concluir mi especialidad y realizar esta tesis.

A los proyectos de la Universidad Nacional Autónoma de México. DGAPA-PAPIIT IN209712, IN217315.

A mi hija Ximena Dulcinea, la persona más importante en mi vida, en mis proyectos, en mis metas, por quien todo tiene un sentido y por quien ha valido la pena todo este sacrificio.

Dedico en especial esta tesis a mis queridos padres, Jonh y Tela, a quien debo lo más valioso que tengo, que es, su cariño y amor.

A la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Darío Fernández Fierro, por permitirme realizar este estudio.

1. ANTECEDENTES

1.1. INTRODUCCION.

La sepsis se define como la presencia (probable o documentada) de infección acompañada de manifestaciones de respuesta inflamatoria sistémica. La sepsis grave se refiere a sepsis disfunción orgánica asociada a sepsis o hipoperfusión tisular. Hipotensión inducida por sepsis se define por una presión sistólica menor a 90mmHg o una presión media menor a 70mmHg, o una disminución de la presión arterial sistólica mayor a 40mmHg, o menor a dos desviaciones estándar para la edad y sin otra causa que explique la hipotensión. El choque séptico se define como la hipotensión inducida por sepsis y persistente a pesar de una adecuada reanimación con líquidos. Hipoperfusión tisular inducida por sepsis se define, como hipotensión inducida por infección, elevación de lactato u oliguria. (Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012). El objetivo terapéutico o el umbral límite para el uso de vasopresores es una presión arterial media > 65mmHg.

1.2. EL ORDEN TEMPORAL Y EL SISTEMA CIRCADIANO

La ritmicidad es una de las características más ubicuas en la naturaleza, los ritmos biológicos se expresan desde organismos unicelulares hasta organismos multicelulares más complejos como las plantas y animales incluyendo al ser humano. La frecuencia en la que se presentan estos ritmos biológicos va desde oscilaciones una vez por segundo (ritmo electroencefalográfico) varias veces por minuto (ritmo respiratorio, ritmo cardiaco) hasta ritmos que oscilan una vez por año conocidos como ritmos circanuales. El ritmo

más común y notorio en la naturaleza es el que se presenta con una frecuencia cercana a las 24 horas conocido como ritmo circadiano, (circa= cercano, dies= día). Estas oscilaciones son evidentes en todos los organismos incluyendo al ser humano (Panda y col., 2002) y esta propiedad de organización temporal es el resultado de mecanismos adaptativos, que responden a las variaciones temporales cíclicas como son el ciclo luz-oscuridad, la temperatura ambiental, la disposición del alimento etcétera (Rusak y Zucker., 1975).

Existe un gran número de variables fisiológicas las cuales presentan fluctuaciones circadianas. La comprensión de este fenómeno temporal ha abarcado un sin número de estudios desde el punto de vista molecular tal como la participación de genes llamados “genes reloj” en la generación del orden temporal, hasta las manifestaciones conductuales y fisiológicas de este fenómeno.

El núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) es el responsable de la generación de dicha temporalidad, y sobre todo es capaz de sincronizar su funcionamiento a eventos ambientales principalmente al ciclo luz-oscuridad, lo que se conoce como sincronización fótica (Herzog y col., 1998; Klein y col., 1991). La información fótica llega al NSQ a través del tracto retino-hipotálamico el cual transmite información luminosa de la retina, estableciendo así una sincronización que consiste en una relación estable entre el tiempo externo y el interno. El NSQ genera entonces un ritmo sincronizado al ambiente externo y lo transmite al resto del organismo a través de múltiples estructuras que funcionan como efectores, principalmente el sistema nervioso autónomo (Buijs y cols., 2001). El principal papel del sistema circadiano es mantener un orden temporal de los diferentes procesos fisiológicos y en armonía con las fluctuaciones diarias del ambiente para permitir anticiparse a estos cambios predecibles y permitir mejor adaptación. Es

aquí donde la adecuada sincronización del reloj circadiano impacta sobre la salud (Buijs y Kreier, 2006; Karlsson y col., 2001; Ángeles-Castellanos y col., 2007).

La homeostasis general es regulada por estructuras hipotalámicas, que a su vez transmiten sus señales por vía humoral o nerviosa a los tejidos periféricos. Las principales vías de tipo neural son las ramas simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo y el balance de actividad entre ambas ramas lleva a una regulación adecuada y balanceada de las funciones viscerales (Buijs y col., 2001). A esta señal homeostática se suma la señal temporal (cronostática) generada por el NSQ que transmite su ritmicidad a prácticamente cualquier parámetro fisiológico a través de las mismas vías. Estas fluctuaciones permiten a los individuos expresar niveles óptimos de cada función de acuerdo a la hora del día.

1.3. SISTEMA CIRCADIANO ARRÍTMICO (SINDROME DE DESINCRONIZACION INTERNA)

La pérdida de coherencia entre el medio externo y el reloj biológico o entre el reloj biológico y las señales que transmite al resto del organismo resultan en el fenómeno de desincronización interna. Esta puede ser producida por una alteración o daño de las vías de sincronización, la cual genera una señal sincronizadora equivocada, según la señal de fase en la que se dé. La velocidad con que el reloj se reajusta a esta nueva señal es lenta, produciendo el fenómeno conocido como síndrome de "jet-lag" (Waterhouse y col., 1997). En estas condiciones los ritmos circadianos dejan de coincidir con el horario externo y por varios días los osciladores hormonales y digestivos se mueven a diferentes velocidades para reajustarse. La pérdida del orden temporal entre el ambiente y los organismos se conoce como desincronización interna y es la causa de malestares generales, del decremento en el desempeño mental, físico, y de otros síntomas

asociados. Otras consecuencias de la desincronización interna son, cansancio durante el día, menor grado de concentración y alerta, desorientación, así como irritabilidad y depresión. Son frecuentes también los desórdenes gastrointestinales derivados de la ingestión de alimentos a un horario inusual, tales como indigestión, diarrea, constipación, acidez estomacal y riesgo de úlceras gástricas y duodenales (Waterhouse y col., 2004). Por otro lado la pérdida de la relación de fase entre el reloj biológico y el medio externo, redundando en una alteración en la salida de señales rítmicas o bien en la transmisión de estas a los efectores, que da como consecuencia un desacoplamiento entre los tejidos periféricos con el reloj. En el síndrome de desincronización interna, además de la pérdida en la ritmicidad del ciclo sueño-vigilia también presentan una desorganización en la alternancia entre estados de hambre y saciedad, generando señales constantes y arrítmicas hacia el sistema circadiano que a su vez transmitirán señales arrítmicas al resto del organismo en particular a los procesos metabólicos y en particular la pérdida de la alternancia entre estados anabólicos y catabólicos a lo largo del día (Buijs y Kreier, 2006; Staels, 2006). Por lo anterior la hipótesis de un sistema circadiano alterado en el síndrome de desincronización interna, propone la pérdida en la ritmicidad de señales endocrinas y autónomas que lleva a desarrollar un estado arrítmico general.

1.4. RITMO CIRCADIANO DE MELATONINA

La melatonina es un aminoácido lipofílico derivado del triptófano, sintetizada por la glándula pineal, con un ritmo circadiano que mantiene niveles altos por la noche y bajos durante el día. También la melatonina es sintetizada en otros órganos, como la retina, tracto gastrointestinal, el timo, la médula ósea y el linfocito, pero sin mantener un ritmo circadiano. La melatonina tiene una vida media muy corta y se metaboliza principalmente a 6 – Sufatoximelatonina en el hígado y se excreta por la orina. La

melatonina está involucrada en la regulación del sueño, pero también con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos, al igual que interviene en mantener la función mitocondrial (Leonardo Loreto et al., Journal of Critical Care, 2015), siendo típicamente inhibida entre las 7:00 y las 9:00 hrs coincidiendo con el pico de cortisol endógeno (Bellapart J. et al., 2012).

La producción y secreción de melatonina es estimulada por fibras del nervio postganglionico de la retina, que pasan a través del tracto retinohipotalámico hacia el núcleo supraquiasmático, luego atraviesan el ganglio cervical superior y finalmente llegan a la glándula pineal. Este sistema neuronal se estimula con la oscuridad y se inactiva con la luz (José Illnait-Ferrer 2012). El ritmo circadiano de la secreción de melatonina es realmente controlado por un marcapaso endógeno independiente situado en el núcleo supraquiasmático, pero la luz ambiental lo hace más lento en forma dosis dependiente (Hardeland R, Fuhrberg B. 1996). La hormona entra por difusión en el torrente sanguíneo, donde tiene un pico de concentración entre las 02:00 y las 04.00 hrs y luego, cae gradualmente durante el resto del periodo de oscuridad (José Illnait-Ferrer, 2012).

La síntesis de melatonina en la glándula pineal está controlada por el núcleo supraquiasmático que está regulado por el ciclo luz/oscuridad a través del tracto retinohipotalámico. Durante la noche, el núcleo supraquiasmático envía señales neurales a través de una vía multisináptica simpática, la vía retino – hipotálamica – pineal. Esta vía consta de los núcleos paraventriculares hipotalámicos, las células intermediolaterales y el ganglio cervical superior, que se proyecta sobre la glándula pineal e induce en ella la liberación nocturna de noradrenalina.

La unión de la noradrenalina a sus receptores específicos situados en las membranas de los pinealocitos (las células de la glándula pineal que segregan melatonina) promueve la activación de la síntesis de melatonina. La formación de melatonina comienza con la captación del aminoácido triptófano, procedente del torrente circulatorio. El triptófano es hidroxilado en la mitocondria por la triptófano hidroxilasa. La mayor parte del 5-HTP resultante se convierte en serotonina en el citosol, gracias a la intervención de una enzima descarboxilasa. Tras ello, la serotonina es acetilada por la arilalquilamina N-acetilserotonina; metabolito que es O-metilado por otra enzima, la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) lo que da lugar a la melatonina. Presenta ésta un perfil rítmico de producción proporcional al estímulo noradrenérgico nocturno, con valores mínimos diurnos y máximos nocturnos. Una vez sintetizada la melatonina, se libera al sistema vascular, accediendo a fluidos, tejidos, compartimentos celulares, como el cerebro, la saliva, orina, folículos preovulatorios, semen, líquido amniótico y leche materna. La melatonina se metaboliza muy de prisa, fundamentalmente en el hígado, eliminándose por la orina. Su principal metabolito en humanos y roedores es la 6-sulfatoximelatonina, que puede encontrarse en sangre y orina.

El ritmo diario de melatonina y corticosterona son los ritmos circadianos endocrinos más estudiados, debido a su amplitud pronunciada y a su sincronización reproducible de su acrofase. La síntesis de melatonina tiene la ventaja de no ser influenciada por el estrés. La síntesis y liberación de melatonina sigue de forma precisa el fotoperiodo ambiental dando una percepción precisa de tiempo diario y anual al resto del tiempo (Reiter 1993). También el incremento anticipatorio de corticosterona precede a cada periodo de actividad de soporte del reloj biológico en la distribución de las señales de tiempo. Sin

embargo la distribución de estas señales diarias parece no ser uniformes con el reloj biológico.

Aunque en un principio solo encuadró a la melatonina en la fisiología circadiana y de la reproducción, estudios posteriores han permitido encuadrarla en otros aspectos de la fisiología intracelular independientes de su acción extracelular como hormona. Así, se observó que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols., 1993). También se han caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuna-Castroviejo y cols., 1993; Becker-Andre y cols., 1994; Wiesenberg y cols., 1998) y en el sistema nervioso central (Acuna-Castroviejo y cols., 1993; Giguere y cols., 1994; Carlberg y Wiesengerg, 1995); se observó la capacidad que tiene la melatonina de unirse a algunas proteínas intracelulares como la proteína C (Benitez King y cols., 1996; Anton- Tay y cols., 1998), la calmodulina (Leon y cols., 2000; Huerto-Delgadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1994), la calreticulina (Macías y cols., 2002; Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Acuna y cols., 2002; Leon y cols., 2004; Leon y cols., 2005).

1.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA.

Debido a que se trata de una molécula altamente lipofílica, es capaz de atravesar membranas celulares, y llevar a cabo funciones que otras moléculas más hidrofílicas no les es posible, además se ha podido observar que es capaz de acumularse en ciertos compartimientos subcelulares como la mitocondria (Acuna y cols., 2002; Acuna – Castroviejo y cols., 2003; Leon y cols., 2004). Entre las funciones mitocondriales más importantes que posee la melatonina podemos encontrar: una función como antioxidante

de acción directa, como antioxidante de acción indirecta, una función sobre NOS y acciones en la fisiología mitocondrial.

Más allá de la capacidad de la melatonina de interactuar junto a receptores o proteínas intracelulares, debido a su capacidad antioxidante intrínseca, tanto la melatonina como algunos de sus metabolitos van a ser capaz de depurar radicales libres de forma directa (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; Leon y colbs., 2004), tanto de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS). Además, de la propiedad de depurar radicales libres de forma directa la melatonina tiene capacidad antioxidante indirecta, y esto es debido a que es capaz de estimular la expresión y/o actividad de algunas enzimas antioxidantes, muchas de ellas muy importantes dado que se encuentran en la mitocondria que es el orgánulo celular donde se producen más del 90% de los radicales libres (Yu y colbs., 1992). La melatonina es una molécula rica en electrones y puede ceder uno de ellos al grupo hidroxilo (OH) (Tan y colbs., 1993; Tan y colbs., 2000), originando un radical indolil; este radical indolil puede a su vez volver a depurar otro OH transformándose en 3- hidroximelatonina cíclica, que se excretada por la orina, o depurar un radical superóxido y originar otro metabolito activo de la melatonina, el AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina) (Hardeland y colbs., 1993; Poeggeler y colbs., 1994). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como el AFMK poseen también capacidad antioxidante, aumentando por tanto el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003). La 3-hidroximelatonina cíclica se excreta vía urinaria y puede ser utilizado como indicador de estrés oxidativo en el organismo vivo (Tan y colbs., 1998; Roberts y colbs., 1998).

En resumen sea por acción directa o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para actuar en la mitocondria y, en consecuencia, proteger

al ADN mitocondrial, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo.

La melatonina presenta también efectos inmunoreguladores (Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008), entre ellos su efecto antiinflamatorio está bien demostrado (Mayo y cols., 2005; Escames y cols., 2006). En procesos inflamatorios agudos como la sepsis, este aumento en la expresión de la iNOS (Óxido nítrico sintetasa inducible) es muy elevado (Escames y cols., 2003; López y cols., 2006), sin embargo la melatonina parece capaz de inhibir la activación de NF- κ B (Factor de transcripción Kappa B) (Cuzzocrea y Reiter, 2001; Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008) y su translocación al núcleo (Chuang y cols., 1996) puede actuar a nivel de las MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) (Cuzzocrea y Reiter, 2001), reduciendo de esta manera la inducción de la expresión de la iNOS, siendo además capaz de reducir la expresión de la iNOS a nivel transcripción (Cuzzocrea y Reiter, 2001).

En varios modelos animales la melatonina ha demostrado proteger contra diversas infecciones, bacterianas, virales y parasitarias, presumiblemente actuando a través de varios mecanismos, como inmunomodulación o actividad antioxidante directa o indirecta (Srinivasan., 2010). La melatonina es un poderoso antioxidante que neutraliza radicales superóxido, así como otras especies de radicales de nitrógeno y que da lugar a una cascada de metabolitos que comparten sus propiedades antioxidantes. La melatonina también actúa indirectamente para promover la expresión de genes de enzimas antioxidantes y para inhibirá la expresión de genes de enzimas prooxidantes (Reiter., 2009). El choque séptico la expresión más severa de la sepsis, es una condición letal, causada por una larga cadena inducida por patógenos de eventos secuenciales intracelulares que ocurren en las células inmunes, epitelio, endotelio y sistema

neuroendocrino. Los efectos letales del choque séptico están asociados con la producción y liberación de numerosos mediadores bioquímicos proinflamatorios, como las citoquinas, óxido nítrico, ROS, especies de nitrógeno, radicales libres junto con el desarrollo de apoptosis masiva. Los trastornos del sueño son comunes en el paciente crítico que presenta pérdida del sueño monofásico, combinado con siestas diurnas frecuentes (patrón de sueño vigilia irregular). Así como una reducción en las fases más profundas, más restauradoras, tales como el sueño de ondas lentas (SOL) y el movimiento ocular rápido (MOR) del sueño. Aunque las consecuencias de tal fragmentación prologada aun se desconocen del todo, pueden ser comparables con la significativa morbilidad asociada a la privación del sueño (Richards Bourne et al., Critical Care 2008).

La secreción nocturna de melatonina sincroniza el ciclo sueño vigilia y los ciclos luz-oscuridad (Cajochec C et al., J Neuroendocrinol 2003, 15: 432-437) y la disrupción de la amplitud y secreción oportuna de melatonina está asociada a una reducción del sueño (Kuhlwein E. et al., BiolPsychiatry 2003). La reducción de los niveles de melatonina en plasma y la falta del ritmo de melatonina han sido demostrado en pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica. La administración de melatonina exógena a mostrado ser segura y efectiva en los trastornos del sueño y del ritmo circadiano (Arendt J. et al., Sleep Medicine Rev 2005).

Pocos estudios clínicos existe en la actualidad, que relacionan las alteraciones en los niveles de melatonina en pacientes con sepsis, y en pacientes hospitalizados en terapia intensiva, en un estudio prospectivo observacional (Shiho Yoshitaka et al., 2013) que incluyó a 40 pacientes en estado posoperatorio y que requirieron estancia al menos durante 48 horas en la unidad de cuidados intensivos, se demostró el desarrollo de

delirio en el 33% de los pacientes, y niveles significativamente bajos de melatonina en el periodo posquirúrgico ($p= 0,036$) en comparación con los que no desarrollaron delirio. Sin embargo los pacientes incluidos en este protocolo requirieron durante la fase de estudio, el uso de propofol y ventilación mecánica, los cuales ya han sido demostrados como factores que intervienen en la disminución de los niveles séricos de melatonina (Avelino C. Verceles et al., 2012). Otro estudio (Perras et al., 2006) indicó que la secreción fisiológica de melatonina fue abolida severamente en los pacientes ingresados a la UCI. Sin embargo, Mundigler y colaboradores en el 2002 describieron un patrón alterado en la secreción circadiana de melatonina en pacientes de la UCI con sepsis (16 de 17 pacientes), y un ritmo circadiano preservado en pacientes de la UCI que no presentaban sepsis (6 de 7 pacientes).

La disminución de las concentraciones de melatonina en los pacientes con sepsis se ha traducido en la instalación de alteraciones en la fase del sueño que incluyen: prolongación en la latencia del sueño, fragmentación y disminución de la eficacia del mismo, numerosos despertares y la disminución o ausencia de la etapa MOR (Movimientos Oculares Rápidos) (Friese et al., 2007; Elliott et al., 2013; Knauert et al., 2014). Se ha demostrado que la pobre calidad del sueño y la inhabilidad para dormir ocupan el segundo lugar como factores de estrés y ansiedad en los pacientes durante su estancia en la UCI (Unidad de Cuidados Intensivos), lo que condiciona un ritmo circadiano desorganizado y limitaciones (Novaes et al., 1999; Rotondi AJ et al., 2012; Simini B., 1999). Diversos estudios han comprobado que dichas alteraciones son potenciadas por factores relacionados con el individuo, como la preexistencia de los desórdenes del sueño, la edad, el dolor y la ansiedad, y con factores relacionados con el ambiente de la UCI. El ruido, que de acuerdo a las recomendaciones de la Agencia de

Protección Ambiental de los Estados Unidos deben de respetarse márgenes de hasta 45 dB durante el día y hasta 35 dB en la noche, sin embargo, se han documentado niveles que superan los 80 dB, los cuales se han asociado con numerosos despertares durante el sueño (Aaron et al., 1996); la exposición a la luz, que se ha demostrado que niveles tan bajos como de 100 a 500 lux pueden inhibir la secreción de melatonina y causar desequilibrios circadianos (Weinhouse et al., 2006); y las actividades intervencionistas (Freedman et al., 1999; Bihari et al., 2012; Gabor et al., 2003).

La ventilación mecánica y el uso de fármacos vasopresores, antibióticos, sedantes y analgésicos han mostrado un impacto negativo en la calidad del sueño y su arquitectura (Cooper AB et al., 2000; Bosma K et al., 2007; Parthasarathy et al., 2004).

En un estudio randomizado doble ciego con controles placebo (S Bourne et al., 2008) que incluyó a 24 pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos, con una estancia mayor a 5 días, con falla respiratoria aguda que requerían de ventilación mecánica, y que presentaban alteraciones en el sueño asociadas a la disminución en las concentraciones de melatonina. A la mitad de estos pacientes se les administraron 10 mg de melatonina exógena por vía oral, a una hora constante (21:00 hrs) durante cuatro noches seguidas, y a la otra mitad se les administró un placebo. A ambos grupos se les permitió el uso a demanda de antifaces y tapones auriculares, así como se hicieron recomendaciones al personal de la unidad para reducir estímulos auditivos o luminosos excesivos. Previo a la intervención se les discontinuó la aplicación de fármacos vasoactivos, sedantes y analgésicos. Se realizaron mediciones de melatonina sérica y evaluaciones del sueño nocturno a través del índice bioespectral derivado del electroencefalograma. Se observaron incrementos en las concentraciones séricas de melatonina similares a las dosis reportadas en los individuos sanos (picos nocturnos),

que aunque iban disminuyendo hacia el amanecer, continuaban con niveles suprafisiológicos. Así también, se encontró que el tiempo de sueño en los pacientes a quienes se les administró la melatonina, se prolongó 1 hora más.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Determinar el ritmo circadiano de melatonina en pacientes con sepsis y sepsis severa, que ingresan a la unidad de cuidados intensivos adultos, en el Hospital General Darío Fernández Fierro, ISSSTE. México, D.F.

3. JUSTIFICACIÓN

Pacientes con sepsis y sepsis grave presentan diferentes alteraciones en diversos órganos, esto se conoce como disfunción orgánica múltiple, una característica especial que hemos observado en los pacientes críticos, es que existe una desincronización interna. Esto debido seguramente a que se pierde un ritmo de ciclo sueño vigilia, debido a las múltiples intervenciones que se tiene que realizar, el tiempo que se mantiene la luz encendida durante la noche y otros fenómenos como los tiempos de ayuno enteral prolongado en algunas situaciones. Todo esto tiene diferentes consecuencias sobre la ritmicidad y secundariamente sobre diferentes procesos metabólicos lo que contribuye a desarrollar síndrome de desincronización interna.

La finalidad de este estudio fue determinar el ritmo circadiano de melatonina en los pacientes con sepsis y sepsis severa y posteriormente determinar si está relacionado con el síndrome de desincronización interna. En una perspectiva a futuro se pretende administrar melatonina con la finalidad de tener un impacto en la fisiopatología de la sepsis y sepsis severa, debido a sus múltiples resultados ya demostrados en diseños

experimentales en animales y en los estudios ya descritos en humanos, con la finalidad de aumentar su nivel de impacto.

Realizar protocolos estandarizados en las unidades de terapia intensiva, para regular la intensidad de la luz, mantener un ciclo luz oscuridad estricto y mejorar las condiciones del ambiente, como el ruido con la aplicación de tapones auditivos en la noche, colocación de antifaz ocular, mejorar la calidad de sueño y la administración de melatonina.

4. HIPÓTESIS

Pacientes con sepsis y sepsis grave presentan alteraciones en el ritmo circadiano de melatonina.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el ritmo circadiano de melatonina en pacientes con sepsis y sepsis severa que ingresan a la unidad de cuidados intensivos, en el Hospital General, Dr. Darío Fernández Fierro. Determinar las condiciones generales de luz a la cual están expuestos los pacientes incluidos en este estudio. Determinar el ritmo circadiano de cortisol durante la fase de estudio.

5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el ritmo circadiano de melatonina.

Determinar el ritmo circadiano de cortisol durante la fase de estudio.

Determinar la intensidad de la luz, para establecer las condiciones de luz a la cual está expuesto el paciente durante la fase de estudio.

6. MÉTODOS Y DISEÑO

Tipo de estudio: Observacional, analítico y transversal.

Se incluyeron en este estudio un total de 20 pacientes que cumplían con el diagnóstico de sepsis o sepsis severa, de los cuales 5 se excluyeron por requerir el uso de vasopresores durante la fase estudio, 3 por desarrollo de delirio y falta de cooperación para la toma de muestras y 2 por no desear continuar el estudio. Los 10 pacientes que permanecieron en el estudio se mantuvieron durante un periodo de tiempo de 24 horas en la Unidad de Terapia Intensiva, se determinó la intensidad de la luz a la cual estaban expuestos, lo cual se cuantificó con un luxómetro electrónico cada 3 horas y se tomaron muestras de saliva cada 3 horas, al final se analizaron un total de 80 muestras de saliva para determinar niveles de melatonina y cortisol.

Este estudio fue realizado en la unidad de cuidados intensivos del Hospital General Darío Fernández Fierro, ISSSTE, bajo las normas de seguridad y ética, bajo consentimiento informado autorizado por familiares o por el propio paciente en los casos en que esto sea posible. El estudio fue realizado en el periodo de octubre del 2014 a enero del 2015, las muestras se procesaron en el laboratorio de Cronobiología Clínica y Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.1. PROCEDIMIENTOS

Se determinaron los niveles de melatonina en saliva cada 3 horas, para caracterizar el ritmo circadiano.

Se determinaron los niveles de cortisol en saliva, los cuales servirán para determinar un ritmo circadiano en específico durante el tiempo de estudio.

Se determino la intensidad de la luz a la cual está expuesto el paciente durante la fase de estudio con un luxómetro marca HER-410 Steren, México y se establecieron las condiciones basales de iluminación.

6.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de sepsis y sepsis severa, este definido en base a los criterios de la guía sobreviviendo a la sepsis (Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shcok: 2012) y hospitalizados en la unidad de terapia intensiva.

Pacientes con edad entre 20 y 80 años.

Consentimiento informado firmado.

Sin tratamiento con vasopresores previo a su ingreso o durante el tiempo de intervención.

6.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes bajo tratamiento con vasopresores o con antecedentes de uso de los mismos previo a su ingreso.

Pacientes fuera del rango de edad considerado para el protocolo.

Paciente con algún padecimiento que impedía la toma de muestras.

6.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Pacientes que durante la obtención de muestras requería manejo con vasopresores.

Pacientes que no deseaba continuar en el estudio.

6.5. DISEÑO

Este estudio se realizó en la unidad de cuidados intensivos del Hospital General Darío Fernández Fierro, ISSSTE, bajo las normas de seguridad y ética, bajo consentimiento informado autorizado por familiares o por el propio paciente en los casos en que esto fue posible. El estudio fue realizado en el periodo de octubre del 2014 a enero del 2015, las diferentes muestras se mantuvieron congeladas y se trasladaron con las medidas de seguridad correspondientes para evitar contagios. Se procesaron en el laboratorio de Cronobiología Clínica y Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se obtuvieron muestras de saliva con una pipeta de plástico estéril y desechable, se colectó 1ml de saliva, tomada por succión del área sublingual y se depositara en tubos eppendorf, las cuales se mantuvieron congeladas en una hielera con hielo seco a una temperatura de -20° Centígrados. Dichas muestras se trasladaron al laboratorio de Cronobiología Clínica y Experimental de la Facultad de Medicina UNAM, en donde se procesaron bajo método de ELISA mediante Kit para melatonina (Melatonin direct Saliva ELISA), cortisol (Cortisol ELISA) respectivamente.

Las muestras de saliva fueron tomadas cada 3 horas, durante un periodo de 24 horas, iniciando a las 07:00 y continuando respectivamente; 10:00, 13:00, 16:00, 19:00, 22:00, 01:00, 04:00 hrs, y se analizaron un total de 80 muestras respectivamente, para determinar niveles de melatonina y cortisol, con la finalidad de determinar el ritmo circadiano de cada uno.

Se midió la intensidad de la luz con un luxómetro electrónico, cada 3 horas, durante la fase de estudio, con la finalidad de establecer las condiciones de iluminación a las cuales se mantuvieron los pacientes en estudio.

Todos los datos obtenidos fueron registrados en hojas individuales del programa Excel, para mantener una base de datos.

Todos los equipos de medición de ELISA se procesaron con un sistema computarizado.

La información obtenida se analizó para estadística descriptiva, calculando promedios, media, desviación estándar, y posteriormente en el programa Statics se analizó mediante sistema estadístico ANOVA de medidas repetitivas. Así mismo se realizaron pruebas Post – Hoc para determinar que medias difieren entre sí.

7. RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO

Se incluyeron en este estudio un total de 20 pacientes, de los cuales 5 fueron excluidos por requerir el uso de vasopresores durante la fase de estudio, 3 desarrollaron delirio y se excluyeron por falta de cooperación para la toma de muestras y 2 decidieron no continuar el estudio. Finalmente 10 pacientes concluyeron el estudio, con una media de edad de 51 años \pm 8,1 todos hospitalizados en el área de terapia intensiva, un promedio de días de estancia de 3, mantenidos en un ambiente de la unidad de cuidados intensivos sin modificación de las condiciones de luz.

Intensidad de luz.

Durante el estudio se observó que existe un patrón muy similar en cuanto a la intensidad de la luz en las diferentes áreas de la unidad de terapia intensiva, con un promedio de 347.07 \pm 41 Lux/min, durante el día y 25 \pm 7.47 lux/min durante la noche, como se muestra en la Fig. 1, el nivel más alto detectado es a las 13:00hrs (990 Lux/min) y el nivel mínimo

registrado fue a las 01:00 hrs (3 Lux/min). Con lo cual podemos demostrar que existe un ritmo en el ciclo luz-oscuridad de aproximadamente 24 horas.

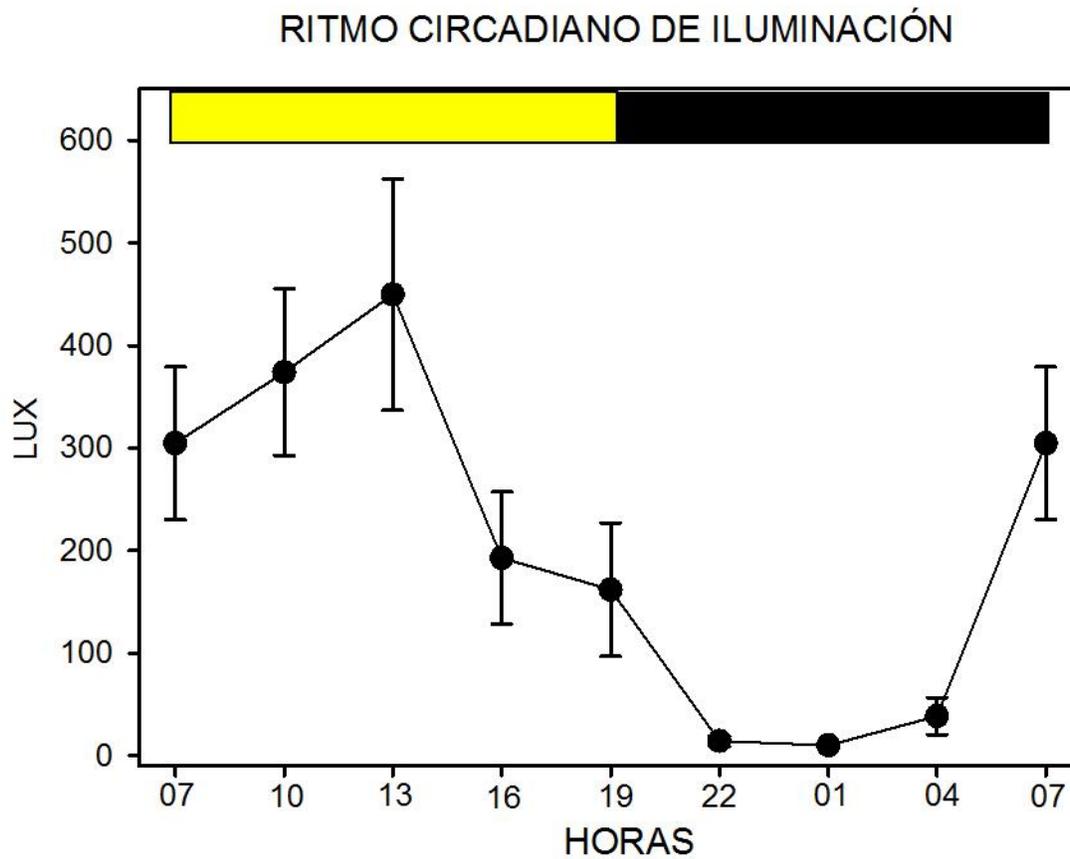


Fig. 1. En la siguiente grafica podemos observa que se mantiene un ritmo en el ciclo luz-oscuridad de aproximadamente 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Melatonina.

Los niveles salivales de melatonina muestran una desorganización del ritmo asociado al ciclo luz oscuridad, ya que existe una gran dispersión entre pacientes por lo cual la desviación estándar no permite que sean significativos todos los valores entre el día y la noche. Sin embargo la acrofase del ritmo de melatonina se conserva (Figura 2), y el

análisis estadístico ANOVA de una vía muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa en el factor tiempo ($F_{(1,7)} = 2,88$; $p < 0.01$).

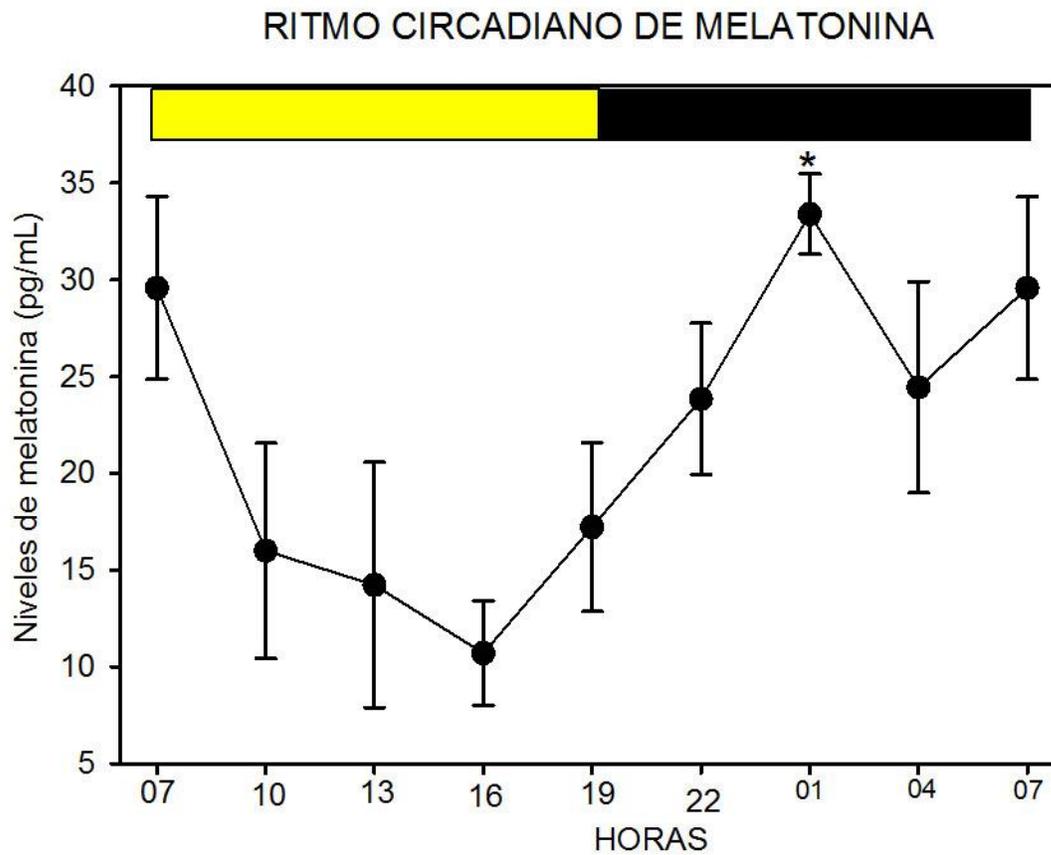


Fig. 2. La acrofase del ritmo de melatonina se conserva (*), sin embargo existe una desorganización del ritmo asociado al ciclo luz oscuridad, ya que existe una gran dispersión entre pacientes.

Ritmo circadiano de cortisol.

Los niveles de Cortisol salival muestran una disminución de la amplitud en el ritmo y por lo tanto un aplanamiento (Figura 3), el ANOVA del factor tiempo, resulta estadísticamente no significativo ($F_{(1,7)} = 0.973$; $p=NS$).

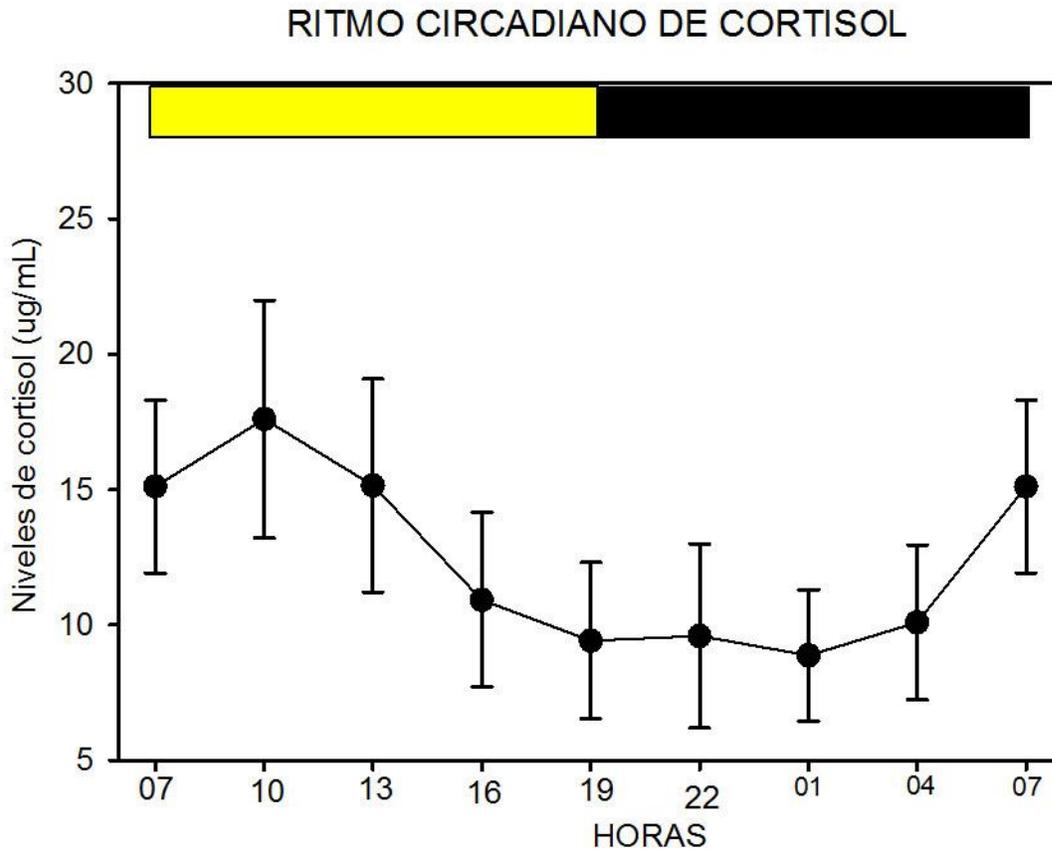


Fig. 3. En la siguiente grafica se observa una disminución de la amplitud en el ritmo y por lo tanto un aplanamiento en el ritmo circadiano.

Relación entre los niveles de melatonina y la intensidad de la luz.

Al comparar los niveles de melatonina con la intensidad de la luz (Fig. 4), vemos que existe un patrón muy similar a lo fisiológico, en el cual los niveles más altos de melatonina se alcanzan cuando la intensidad de la luz es más baja y viceversa, sin

embargo en el punto temporal de las 07:00 vemos como a pesar de que la intensidad de luz registrada es alta (300 Lux/min), existe un incremento en el nivel de melatonina lo cual muestra que la influencia de la luz en este punto temporal no influye sobre los niveles de melatonina.

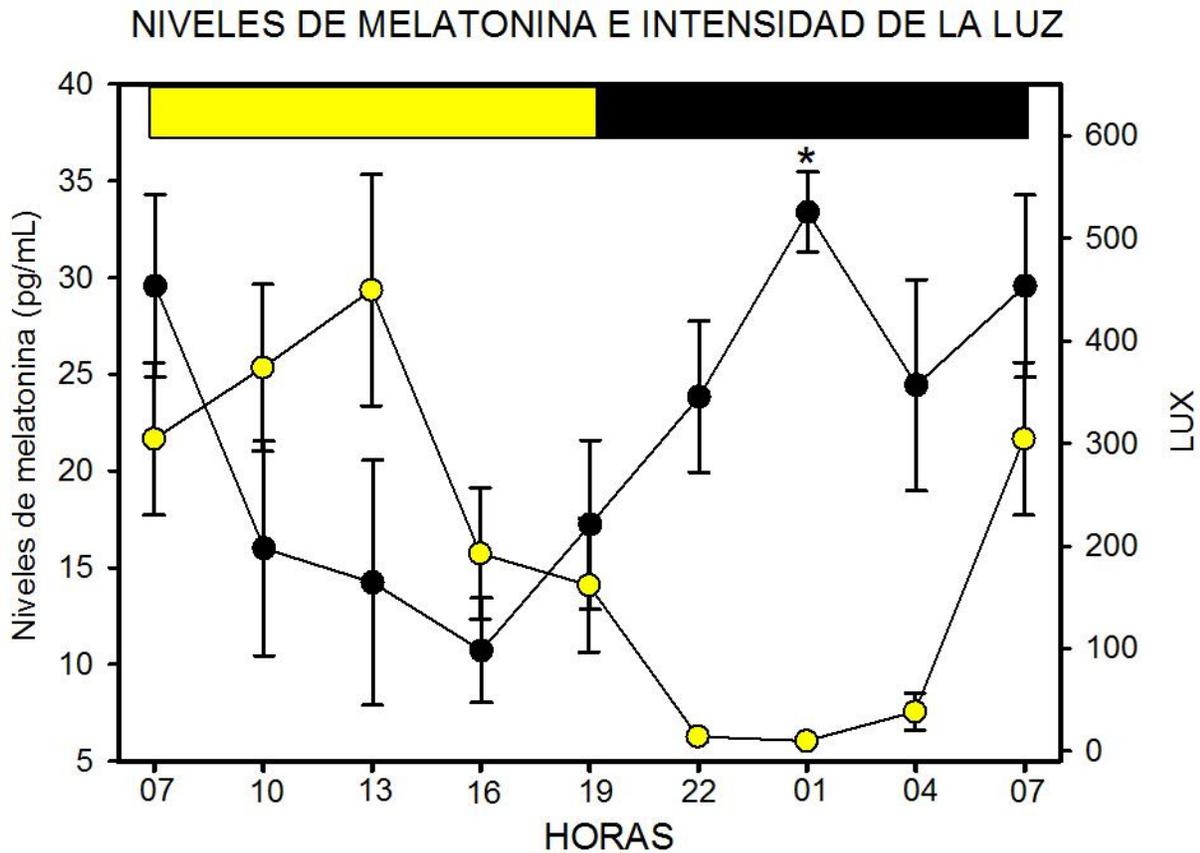


Fig. 4. La siguiente grafica compara la influencia de la luz sobre la melatonina, observe como la influencia de la luz en el punto temporal de las 07:00hrs no influye sobre los niveles de melatonina.

8. DISCUSIÓN

Actualmente existen algunos estudios experimentales en animales, que demuestran la importante influencia que tiene la sepsis en la pérdida de los ritmos circadianos y que intentan limitar el curso de la historia natural de la sepsis al administrar melatonina exógena. La primera evidencia de que la melatonina controla el daño inducido por lipopolisacáridos realizado en ratas, fue reportado por Sewerynek y colaboradores. Aunque hay pocos estudios clínicos experimentales en humanos, la mayoría coincide en que hay diversos factores que influyen en la pérdida de los ritmos circadianos, siendo los principales; el ambiente hospitalario, la influencia de la luz constante en las unidades médicas, falta de un control estricto para mantener un ciclo luz-oscuridad, el ruido, falta de horarios fijos de alimentación, algunos fármacos como vasopresores y sedantes, desarrollo de delirio y la presencia de sepsis por sí sola.

La melatonina ha mostrado beneficios en el manejo del choque séptico, se presume que tiene propiedades antiinflamatorias que disminuyen la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α , suprime la expresión genética de la óxido nítrico sintetasa inducible y también ha mostrado un fuerte efecto antiapoptótico (Venkataramanujan Srinivasan 2010). En el estudio de Verceles A.C. et al., Critical Care (2012), en el cual se analizaron 7 pacientes en condiciones de UCI, se demostró que existe una diferencia en los niveles de intensidad de luz en el factor tiempo, con una significancia estadística ($p < 0,001$) sin embargo el análisis de niveles de 6-Sulfatoximelatonina (metabolito final de melatonina) no mostró significancia estadística en el factor tiempo ($p < 0.5$), en la regresión lineal entre los niveles de intensidad de luz y niveles de 6-Sulfatoximelatonina no se apreció una relación entre ellos. Al compararlo con nuestro estudio, podemos demostrar que a pesar de que se mantiene un ritmo

circadiano muy similar al fisiológico, manteniendo una acrofase a las 01:00hrs, existe una desorganización del ritmo en un punto temporal, en el cual también la influencia de la luz no interviene en disminuir los niveles de melatonina (punto temporal 07:00hrs), lo cual puede ser explicado por pérdida del ritmo circadiano, o como una respuesta al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado a sepsis, como lo ha demostrado Venkataramanujan Srinivasan et al., en su estudio de Melatonin in septic shock (2010).

Nuestro estudio fue con la finalidad de caracterizar el ritmo circadiano de melatonina en pacientes con sepsis, y la influencia de la luz a la cual están expuestos nuestros pacientes en la unidad de cuidados intensivos, además de haber sido muy estrictos con los criterios de exclusión, con la finalidad de eliminar cualquier condición que pudiera influir directa o indirectamente sobre los niveles de melatonina y así darle mayor peso a nuestra hipótesis. En otro estudio prospectivo observacional (Shiho Yoshitaka et al., 2013) que incluyó a 40 pacientes en estado posoperatorio y que requirieron estancia al menos durante 48 horas en la unidad de cuidados intensivos, se demostró el desarrollo de delirio en el 33% de los pacientes, y niveles significativamente bajos de melatonina en el periodo posquirúrgico ($p= 0,036$) en comparación con los que no desarrollaron delirio. Sin embargo los pacientes incluidos en este estudio requirieron durante la fase de estudio, el uso de propofol y ventilación mecánica, lo cual ha sido ya demostrado como factores que intervienen en la disminución de los niveles séricos de melatonina (Avelino C. Verceles et al., 2012), lo cual genera la duda en si la asociación entre los niveles bajos de melatonina y desarrollo de delirio son significativos. Por tal motivo en nuestro estudio excluimos cualquier condición ya determinada, que contribuya en modificar los niveles de melatonina.

8.1. CONCLUSIONES.

La pérdida de los ritmos circadianos se considera multifactorial, la asociación entre sepsis y la pérdida del ritmo circadiano de melatonina, puede ser demostrada al excluir otros factores asociados como lo son medicamentos, ventilación mecánica y los cambios fisiológicos propios de la edad, nuestro estudio demuestra que la sepsis por si sola tiene una gran influencia en la pérdida del ritmo circadiano de melatonina. También pudimos demostrar que la influencia de la luz no fue un factor que intervino en los niveles de melatonina, lo cual abre paso a realizar nuevos estudios, ampliando nuestro universo de estudio, realizar manipulaciones, manteniendo ciclos estrictos de luz - oscuridad y realizar intervenciones con melatonina exógena, con la finalidad de resincronizar o para prevenir la pérdida de los ritmos circadianos.

8.2. PERSPECTIVAS A FUTURO.

Nuestro estudio tiene la finalidad de poder contribuir en el conocimiento de los ritmos circadianos y como se ven éstos afectados en los pacientes que se encuentran en condiciones de hospitalización en una unidad de cuidados intensivos.

Tenemos la finalidad de poder publicar el estudio realizado y abrir nuevos proyectos de investigación, ya que en la actualidad existen pocos estudios clínicos.

En un futuro, se pretende determinar, si las alteraciones en el ritmo de melatonina se correlacionan con el síndrome de desincronización interna.

Se pretende administrar melatonina con la finalidad de tener un impacto en la fisiopatología de la sepsis y sepsis severa, esto en base a los resultados demostrados

en diseños experimentales tanto en animales como en humanos, con la finalidad de aumentar su nivel de impacto.

Realizar protocolos estandarizados en las unidades de terapia intensiva, para regular la intensidad de la luz, mantener un ciclo luz oscuridad estricto y mejorar condiciones del ambiente con la aplicación de tapones auditivos en la noche, colocación de antifaz ocular, mejorar la calidad de sueño y la administración de melatonina.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Surviving Sepsis Campaign. International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012.
2. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human, *Nature* 417:329–335.
3. Rusak B, Zuckerl (1975) Biological Rhythms and Animal Behavior. *Animal Rev. of Psychology* 26:137-171.
4. Herzog ED, Takahashi JS, Block GD (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons, *Nat. Neurosci* 1:708–713.
5. Buijs RM, Chun SJ, Nijima A, Romijn HJ & Nagai K (2001) Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *Journal of Comparative Neurology* 431:405–423.
6. Buijs RM Kreier F (2006) The metabolic syndrome: a brain disease? *J. Neuroendocrinol.* 18:715–716.
7. Ángeles–Castellanos M, Mendoza J, Escobar C (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* 144:344-355.
8. Waterhouse J, Atkinson G, Reilly T (1997) Jet lag. *Lancet*, 350:1611–16.
9. Waterhouse J, Jones K, Edwards B, Harrison Y, Nevill A, Reilly T (2004) Lack of evidence for a marked endogenous component determining food intake in humans during forced desynchronisation. *Chronobiol Int*, 21:443–66.

10. Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental: efecto protector de la melatonina. Tesis doctoral, López García Luis Carlos. Departamento de Fisiología. Universidad de Granada. 2005.
11. Circadian rhythm disruption in severe sepsis: the effect of ambient light on urinary 6-sulfatoxymelatonin secretion. Avelino C. Verceles. Intensive Care Med (2012) 38:804-810.
12. Melatonin in septic shock: Some recent concepts. Venkataramanujan Srinivasan PhD. et al., Journal of Critical Care (2010) 25, 656. e1-656.e6.
13. Perioperative plasma melatonin concentration in postoperative critically ill patients: its association with delirium. Shiho Yoshitaka MD et al., Department of Anesthesiology and Resuscitology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikatachou, Okayama, Okayama 700-8525, Japan. Journal of Critical Care (2013) 28, 236-242.
14. Melatonina: actualidad de una hormona olvidada. José Illnait-Ferrer. Revista CENIC, Ciencias Biológicas, Vol. 43, num. 3, septiembre- diciembre 2012, la Habana cuba.
15. S. Bourne Richard, H Mills Gary, Cosetta Minelli (2008) Melatonin therapy to improve nocturnal sleep in critically ill patients: encouraging results from a small randomised controlled trial. Critical care vol. 12 no. 2.12:R52
16. Huang Hua-Wei, Zheng Bo-Lu (2015) Effect of oral melatonin and wearing earplugs and eye masks on nocturnal sleep in healthy subjects in a simulated intensive care unit environment: Which might be a more promising strategy for ICU sleep deprivation? Critical care 19:124
17. Pisani Margaret A, Friese Randall S. Gehlbach Brian K (2014) Sleep in the intensive care unit. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Vol. 191, no. 7.

18. Arendt Josephine, Skene Debra Jean (2005) Melatonin as a chronobiotic Sleep Medicine Reviews 9, 25–39
19. Silber Michael H., Ancoli-Israel Sonia et cols. (2007) The visual scoring of sleep in adults. Journal of Clinical Sleep Medicine, Vol. 3, No. 2
20. Huang Hua-Wei, Jiang Li et cols. (2014). Impact of oral melatonin on critically adult patients with ICU sleep deprivation: study protocol for randomized controlled trial. Trials Journal 15:327
21. Fuller Patrick, Sherman David et cols. (2011) Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. The Journal of Comparative Neurology 519:933-956
22. Hardeland R, Fuhrberg B. Ubiquitous melatonin-presence and effects in unicells, plant and animals. Trends comp Biochem Physiol. 1996, 2; 25-45.
23. Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2004) C-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286:R159-R165.
24. Ángeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado R, Escobar C (2007) Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos Rev Fac Med UNAM Vol.50 No.6 Noviembre-Diciembre:238-241.
25. Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodríguez K, Buijs RM and Escobar C (2008) Expectancy for food or expectancy for chocolate revealing systems for metabolism and reward, Neuroscience,
26. Boulamery-Velly A, Simon N, Vidal J, Mouchet J, Bruguerolle B (2005) Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats, Chronobiol. Int. 22:489–498.

27. Broberger C (2005) Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks, *J. Intern. Med.* 258:301–327.
28. Cassone VM, Stephan FK (2002) Central and peripheral regulation of feeding and nutrition by the mammalian circadian clock: implications for nutrition during manned space flight, *Nutrition* 18:814–819.
29. Comperatore CA, Stephan FK (1987) Entrainment of duodenal activity to periodic feeding, *J. Biol. Rhythms* 2:227–242.
30. Dadoun F, Darmon p, Achard V, Boullu-Ciocca S, Philip-Joet F, Alessi MC, Rey M, Grino M, Dutour A (2007) Effect of sleep apnea syndrome on the circadian profile of cortisol in obese men *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E466-E474.
31. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus, *Genes Dev.* 14:2950–2961.
32. Dawson D, Armstrong SM. (1996) Chronobiotics--drugs that shift rhythms *Pharmacology and Therapeutics* 69, (1): 15-36.
33. Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus, *Genes Cells* 6:269–278.
34. Hirao J, Arakawa S, Watanabe K, Ito K, Furukawa T (2006) Effects of restricted feeding on daily fluctuations of hepatic functions including p450 monooxygenase activities in rats, *J. Biol. Chem.* 281:3165–3171.
35. Hirota T, Fukada Y (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals, *Zoolog. Sci.* 21:359–368.

36. Honma KI, Honma S, Hioshige T (1983) Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats, *Am. J. Physiol.* 245:R339–R344.
37. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B (2001) Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people, *Occup. Environ. Med.* 58:747–752.
38. Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York.
39. Kobayashi H, Oishi K, Hanai S, Ishida N (2004) Effect of feeding on peripheral circadian rhythms and behaviour in mammals, *Genes Cells* 9:857–86
40. Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:171–195.
41. Saito M, Murakami E, Suda M (1976) Circadian rhythms in disaccharidases of rat small intestine and its relation to food intake, *Biochim. Biophys. Acta* 421:177–179.
42. Slotten HA, Krekling S, Sicard B, Pévet P.(2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res.* 133(1):11-
43. Staels B (2006) When the Clock stops ticking, metabolic syndrome explodes, *Nat. Med.* 12:54–55.
44. Stephan FK (2002) The “other” circadian system: food as a Zeitgeber, *J. Biol. Rhythms* 17:284–292.